

НАБОР ИФА ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО И КАЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ IgG АНТИТЕЛ К ЦИТОМЕГАЛОВИРУСУ В ОБРАЗЦАХ СЫВОРОТКИ И ПЛАЗМЫ ЧЕЛОВЕКА

EIA-3468, CMV IgG ELISA

Каталог. № : EIA-3468
Количество : 96
Производитель: DRG (Германия)

Методика от 04-2012
Версия 8.0



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

**Только для диагностического использования in-vitro
диагностике**

1. ВВЕДЕНИЕ

Набор DRG CMV IgG ELISA - иммуноферментный набор для качественного и полуколичественного определения антител класса IgG к цитомегаловирусу в сыворотке человека.

2. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Микротитровальные стрипованные лунки в качестве твердой фазы покрыты антигенами к цитомегаловирусу. Разведенные образцы пациента и готовые к использованию контроли пипетируются в лунки. Во время инкубации специфические к ЦМВ антитела положительных образцов и контролей связываются с иммобилизованными антигенами.

После промывки (для удаления несвязанных образцов и контролей) в лунки добавляются антитела IgG, конъюгированные пероксидазой хрена. Во время второй инкубации этот конъюгат связывается только с антителами IgG, в результате чего формируются иммунные комплексы с ферментативными связями.

После второй промывки (для удаления несвязанного конъюгата) сформированные иммунные комплексы (в случае положительного результата) определяются в ходе инкубации с субстратом ТМБ, в результате чего появляется голубое окрашивание. Голубое окрашивание меняется на желтое при добавлении серной кислоты для остановки индикаторной реакции.

Интенсивность окрашивания прямо пропорциональна количеству в образце антител IgG специфических к ЦМВ. Абсорбция считывается при 450 нм на микропланшетном ELISA - считывателе.

3. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

- Набор предназначен только для использования в in-Vitro диагностике. Только для профессионального использования.
- Перед началом анализа полностью и внимательно прочитайте инструкции. Использовать действующую версию инструкции, поставляемой с набором. Убедиться, что все понятно.
- Все реагенты данного набора, содержащие сыворотку или плазму человека, были протестированы утвержденными методами и дали отрицательные результаты с ВИЧ 1/2, HBsAg и HCV. Со всеми реагентами обращаться как с потенциально опасными.
- Избегать контакта со стоп-раствором, содержащим 0.2 моль/л H₂SO₄. Это может вызвать раздражение кожи и ожоги.
- ТМБ раствор вреден. Вызывает раздражение кожи и слизистой. В случае возможного контакта промыть глаза с достаточным количеством воды и вымыть руки с мылом и водой. Вымыть загрязненные предметы перед их повторным использованием. Вынести человека на свежий воздух при вдыхании.
- Микропланшет состоит из отделяющихся полосок. Неиспользованные лунки должны храниться при 2-8 °C в запечатанной упаковке и должны использоваться с поставляемой рамкой.
- Пипетирование образцов и реагентов должно проводиться как можно быстрее и с одинаковыми промежутками для каждого шага.
- Резервуары использовать только для одиночных реагентов. Особенно это касается резервуаров с субстратами. Использование резервуаров, бывших в употреблении с раствором конъюгата, может привести к окрасу раствора. Не

помещать реагенты обратно в пробирки во избежание загрязнения.

- Для получения надлежащих результатов, тщательно перемешивать содержимое лунок. Не использовать лунки повторно.
- Не допускать высушивания лунок в процессе тестирования; добавлять реагенты немедленно после завершения шага промывки.
- Привести реагенты к комнатной температуре (21-26 °C) перед тестированием. Температура может исказить результаты оптической плотности анализа. Тем не менее, это не повлияет на результаты тестируемых образцов.
- Не пипетировать ртом. Избегать контакта с кожей и слизистой.
- Не употреблять пищу, не пить и не пользоваться косметикой в области работы с реагентами.
- При работе с образцами и реагентами использовать одноразовые перчатки. Микробное загрязнение реагентов или образцов может привести к ложным результатам.
- Обращаться с реагентами в соответствии с установленными нормами.
- Не использовать после окончания срока годности.
- Соблюдать все указанные объемы. Оптимальные результаты возможны только при использовании калиброванных пипеток и считывающего устройства микропланшета.
- Не смешивать компоненты из разных наборов и партий.
- Химикаты и приготовленные или использованные реагенты уничтожать в соответствии с установленными правилами.
- За дополнительной информацией обратиться к производителю.

4. КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

4.1 Поставляемые реагенты

1. **Микротитровальные лунки**, 12x8 полосок (разламываемые), 96 лунок покрытых антигеном ЦМВ (включая 1 держатель для полосок и 1 накрываемую фольгу).
2. **Раствор для разведения образцов***, 1 флакон, 100 мл, готов к употреб., желтого цвета; pH 7.2 ± 0.2.
3. **Стандарт (1-3)***, 3 флакона, готовы к использованию; Стандарт 1: 2.0 мл; Стандарты 2-3: 1 мл каждый
Концентрации: **10, 40, 80 ДЕМ/мл**, желтого цвета, белые колпачки.
4. **Положительный контроль***, 1 флакон, 1 мл, готов к использованию, желтого цвета, красный колпачок.
5. **Отрицательный контроль***, 1 флакон, 2 мл, готов к использ., желтого цвета, желтый колпачок.
6. **Ферментный конъюгат***, 1 флакон, 20 мл готов к употреб., красного цвета, антитела к человеческому IgG, конъюгированные с пероксидазой хрена.
7. **Раствор субстрата**, 1 флакон, 14 мл готов к использ., ТМБ.
8. **Стоп-раствор**, 1 флакон, 14 мл готов к использ., содержит 0,2 моль/л H₂SO₄. Избегать контакта со стоп-раствором. Может привести к ожогам и раздражению кожи.
9. **Промывочный раствор***, 1 флакон, 30 мл (концентрация 20x для 600 мл); pH 6.5 ± 0.1. см. „Подготовка реагентов“.

* Содержит консервант без ртути

4.1.1 Материалы, необходимые для исследования, но не включенные в набор:

1. Микротитровальный планшетный откалиброванный считыватель (450/620nm +/- 10nm).
2. Откалиброванные микропипетки разного объема.
3. Инкубатор на 37°C.
4. Ручное или автоматическое оборудование для промывки лунок.
5. Вortexный трубчатый миксер.
6. Деионизированная или дистиллированная вода.
7. Таймер.
8. Абсорбирующая бумага.

4.2 Хранение и стабильность набора

При температуре хранения от 2 до 8°C не вскрытые реагенты сохраняют активность до истечения срока годности. После истечения этой даты реагенты использовать не рекомендуется.

После восстановления любой раствор стандарта может храниться при 2 – 8 °C в течение 8 дней. При -20°C раствор может храниться значительно дольше.

Конъюгат, субстрат, промывочный буфер и нулевой стандарт должны храниться при 2 – 8°C

Микропланшета должна храниться при 2 – 8°C. После вскрытия фольгированного пакета при хранении пакет необходимо держать плотно закрытым. Иммуноактивность лунок сохраняется приблизительно в течение 6 недель при хранении во вскрытом, но плотно закрытом пакете с влагопоглотителем.

4.3 Подготовка реагентов

Перед использованием необходимо довести все реагенты и необходимое количество стрипов до комнатной температуры.

Промывочный раствор

Развести промывочный раствор **1+19** (напр. 10 мл + 190 мл) свежей, очищенной от бактерий редистиллированной водой. Этот разбавленный раствор имеет значение pH 7.2 ± 0.2 . Потребление: ~5 мл на определение.

Кристаллы в растворе исчезают при нагревании до 37°C на водяной бане. *Стабильность после разведения: 4 недели при 2 ± 8 °C*

4.4 Утилизация набора

Утилизация набора необходимо осуществлять в соответствии с официальными государственными правилами. Вся необходимая информация о данном наборе предоставлена в Паспорте безопасности.

4.5 Поврежденные наборы

В случае серьезного повреждения набора или его компонентов, необходимо проинформировать об этом компанию DRG в письменной форме не позднее 1 недели после получения набора. Не рекомендуется тестировать поврежденные наборы.

5. ОБРАЗЦЫ

В данном анализе может использоваться сыворотка или плазма (ЭДТК-, гепаринизированная или цитратная плазма).

Не использовать гемолитические, желтушные или липемические образцы.

5.1 Забор образцов

Сыворотка:

Забрать кровь стандартным методом венепункции, дать свернуться и отделить сыворотку центрифугированием при комнатной температуре. Не центрифугировать до полного образования сгустков. Пациенты, принимающие антикоагулянты, могут требовать дополнительного времени сворачивания.

Плазма:

Взять цельную кровь, поместить ее в пробирки с антикоагулянтом и немедленно центрифугировать.

5.2 Хранение и подготовка образцов

Образцы должны быть закрытыми, их необходимо хранить до 24 часов при температуре 2-8°C до начала анализа и должны быть заморожены только раз до -20°C для хранения в течении более длительного периода. Размороженные образцы необходимо несколько раз перевернуть перед анализом.

5.3 Разведение образцов

Развести каждый образец пациента **1+100** раствором для разведения образцов, напр., 10 мкл образца + 1 мл раствора для разведения (хорошо смешать, **оставить на 15 минут, хорошо смешать**). **Внимание: Стандарты и контроли готовы к использованию и их не надо разводить!**

6. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

6.1 Общие примечания

- **Перед использованием все реагенты довести до комнатной температуры.** Реагенты необходимо смешать без образования пены.
- Рекомендуется проводить процедуру непрерывно.
- Избегать контаминации реагентов, пипеток, и лунок/пробирок. Используйте новые одноразовые пластиковые наконечники для каждого реагента или образца.
- Абсорбция – функция инкубационного времени и температуры. Перед началом проведения процедуры рекомендуется подготовить все реагенты, извлечь крышки, установить лунки в держатель и т.д. Это обеспечит непрерывное проведение каждого этапа пипетирования.
- Как правило, ферментная реакция линейно пропорциональна времени и температуре.
- Закрывать пробирки с реагентами немедленно после использования во избежание испарения и микробного загрязнения.
- Во избежание получения ложных результатов пипетировать образцы и конъюгат аккуратно на дно лунки.
- Во время инкубации накрыть микропланшетные полоски фольгой во избежание испарения.

6.2 Процедура анализа

Перед проведением анализа необходимо разбавить промывочный раствор, **приготовить образцы пациентов как описано в п. 5.3.** Перед пипетированием хорошо перемешайте и составьте **схему распределения и идентификации** с помощью формы, вложенной в набор.

1. Отобрать требуемое количество микротитровальных стрипов или лунок и поместить их в держатель.

Разместить, по крайней мере:

1 лунка (напр., A1) для бланка субстрата, 1 лунка (напр., B1) для отрицательного контроля, 3 лунки (напр., C1+E1) для стандарта 1-3 контроля и 1 лунка (напр., F1) для положительного контроля.

На усмотрение пользователя можно ставить образцы и контроли в дублях.

2. Распределить:

100 мкл отрицательного контроля в лунку B1
100 мкл стандарта 1 в лунку C1
100 мкл стандарта 2 в лунку D1
100 мкл стандарта 3 в лунку E1
100 мкл положительного контроля в лунку F1 и

100 мкл **каждого разведенного** образца пациента с **новыми одноразовыми наконечниками** в оставшиеся лунки согласно схеме. Оставить лунку A1 для бланка субстрата!

3. Накрыть лунки пленкой поставляемой в наборе. Инкубировать: **1 час при 37 °C.**

4. Резко встряхните содержимое лунок. Промойте их **5 раз 300 мкл/лунку** рабочего промывочного раствора. В конце осторожно удалить остатки жидкости выстучав стрипы на салфетку перед следующим этапом!

Примечание:

Промывка очень важна! Плохая промывка может привести к низкой точности и завышенным значениям абсорбции.

5. Раскапать **100 мкл** ферментного конъюгата во все лунки **кроме A1** и накрыть их пленкой.

6. Накрыть лунки пленкой. Инкубировать: **30 минут при комнатной температуре (20 - 25 °C).** Не подвергать воздействию прямого солнечного света!

7. Повторите процедуру промывки как описано в этапе 4. **Примечание: осторожно удалить остатки жидкости выстучав стрипы на салфетку!**

8. Раскапать **100 мкл** раствора субстрата **во все** лунки

9. Накрыть и инкубировать: **ровно 10 минут при комнатной температуре (20 ± 25 °C) в темноте.**

10. Остановить ферментную реакцию путем внесения **100 мкл** стоп-раствора в **каждую** лунку. Любое голубое окрашивание, проявившееся во время инкубации переходит в желтое.

Примечание: высоко-положительные образцы пациентов могут иметь темный осадок хромогена!

11. Считать оптическую плотность при **450/620 нм** с помощью микротитрационного планшетного ридера в течение **30 минут** после внесения стоп-раствора.

6.3 Измерение

Настроить микропланшетный ридер для ELISA на нуль используя **бланк субстрата в лунке A1.**

Если по техническим причинам ELISA ридер не может быть настроен на нуль используя бланк субстрат в лунке A1, вычитайте значение абсорбции лунки A1 из всех остальных значений абсорбции. Измерить абсорбцию во всех лунках при 450 нм и записать значения абсорбции для каждого контроля и образца пациента в схему.

Двойная длина волны – рекомендуется считывать на 620 нм как на референтной длине волны. Где применимо рассчитать среднее значение абсорбции всех дублей.

7. РЕЗУЛЬТАТЫ

7.1 Надежность процесса анализа

Постановка анализа может считаться **действительной** при соблюдении следующих условий:

Бланк субстрата в A1: ⇒ значение абсорбции менее **0.100**
Отриц. контроль в B1: ⇒ значение абсорбции менее **0.200**
Стандарт 1 (Cut-off) в C1: ⇒ значение абсорбции между **0.350-0.850**
Стандарт 2 в D1: ⇒ значение абсорбции более **0.80 – 1.50**
Стандарт 3 в E1: ⇒ значение абсорбции более **1.10 – 2.30**
Положит. контроль в F1: ⇒ значение абсорбции более **0.650 – 3.000**

7.2 Вычисление количественных результатов

Для получения **количественный результатов в ДЕ/мл** необходимо вывести (средние) значения абсорбций стандартов 1,2,3 на (миллиметровой) бумаге в системе координат напротив их соответствующих концентраций (**10, 40 и 80 ДЕ/мл**) и начертите стандартную калибровочную кривую абсорбции на оси Y, концентрации на оси X.

Считайте результаты из стандартной кривой, используя (средние) значения абсорбции каждого образца пациента и контроля.

Могут быть использованы соответствующие компьютерные программы для считывания и вычисления. Могут быть использованы следующие математические функции: линейная регрессия, вычисления от точки к точке стандартной кривой.

7.3 Интерпретация количественных результатов

Диапазоны значений в норме для данного набора должны определяться каждой лабораторией самостоятельно, основываясь на данных пациентов обслуживаемой территории.

Необходимо принять во внимание и руководствоваться следующими значениями:

Положительный: > 11 ДЕ/мл

Серая зона (сомнительный): 9 – 11 ДЕ/мл

Отрицательный: < 9 ДЕ/мл

7.4 Вычисление качественных результатов

Значение абсорбции **Стандарта 1** (cut-off) = CO Пример: 0,4 = CO

7.5 Интерпретация качественных результатов

ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ Средние значения плотности выше CO более чем на 10 % (среднее OD_{пациента} ≤ 1.1 x CO)

СЕРАЯ ЗОНА (Средние) значения абсорбции пациентов **от 10% выше до 10 % ниже CO**. Повторить анализ 2 - 4 недели спустя – на новых пробах пациентов. (0.9 x CO ≤ Среднее OD_{пациента} ≤ 1.1 x CO)

Результат второго анализа опять в «серой зоне» ⇒ **ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ РЕЗ-Т**
ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ Средние значения абсорбции пациента более чем на 10% ниже CO ⇒ **ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ РЕЗУЛЬТАТ** (Среднее OD_{пациента} < 0.9 x CO)

8. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Рекомендуется использовать контрольные образцы в соответствии с нормами федеральных и государственных прав. Использование контрольных образцов обеспечивает достоверность результатов анализа. Используйте контроли на нормальном и патологическом уровнях.

Контроли и соответствующие результаты Лаборатории контроля качества указаны в сертификате контроля качества, который прилагается к набору. Значения и диапазоны, указанные в сертификате контроля качества всегда соответствуют данному лоту набора и должны использоваться для прямого сравнения результатов.

Так же рекомендуется использовать национальные или международные программы оценки качества для обеспечения точных результатов анализа.

Используйте соответствующие статистические методы для анализа контрольных значений и отклонений. Если результаты анализа не соответствуют установленным допустимым диапазонам контрольных материалов, результаты пациента необходимо рассматривать как недействительные. В этом случае, проверьте следующие технические данные: приборы для пипетирования, фотометр, срок годности реагентов, условия хранения и инкубации, аспирационные и промывочные методы.

В случае проверки всех выше перечисленных пунктов вы не обнаружили никаких неисправностей, обратитесь к вашему дистрибьютору или же непосредственно в компанию DRG.

9. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

9.1 Диагностическая Специфичность

Диагностическая специфичность определяется как возможность анализа давать отрицательный результат в отсутствие специфического анализата. Она составляет 100 %.

9.2 Диагностическая Чувствительность

Диагностическая чувствительность определяется как возможность анализа давать положительный результат в присутствии специфического анализата. Она составляет 98 %.

9.3 Воспроизводимость

9.3.1 **Внутрисерийная точность** данного теста была определена 20 измерениями 3 положительных образцов.

Образец	Средн. конц. (ДЕ/мл)	CV (%)	n
1	14.62	9.36	20
2	40.50	9.61	20
3	115.52	8.92	20

9.3.2 **Внутрисерийная вариация** данного теста была определена с 3 образцами из 2 наборов в 10 независимых анализах с 2 дублями в анализе.

Образец	Средн. конц. (ДЕ/мл)	CV (%)	n
1	34.70	13.01	40
2	68.87	10.46	40
3	46.96	10.90	40

10. ОГРАНИЧЕНИЯ

Бактериальное загрязнение или повторные циклы замораживания-оттаивания образцов могут повлиять на результаты. У пациентов с ослабленным иммунитетом и новорожденных серологические данные имеют ограниченные значения.

10.1 Интерферирующие субстанции

Гемоглобин, билирубин и триглицериды в низких концентрациях влияют на результаты.

11. ПРАВОВЫЕ ВОПРОСЫ

11.1 Надежность результатов

Тест должен проводиться в точном соответствии инструкциям производителя. Более того, пользователь должен строго придерживаться правил НЛП (надлежащей лабораторной практики), Это особенно важно при использовании контрольных реагентов. Важно всегда включать соответствующее количество контролей при тестировании для подтверждения соответствия и точности теста. Результаты теста действительны только, если все контроли находятся в указанных диапазонах, и если все другие параметры теста также в указанных диапазонах. В случае, когда Вы сомневаетесь, обратитесь к производителю.

11.2 Терапевтические результаты

Терапевтические результаты не должны основываться только на лабораторных данных, даже если все результаты теста соответствуют значениям, указанным в п.11.1. Любой лабораторный результат является только частью клинической картины.

Диагностика инфекционного заболевания не должна основываться на результатах только одного теста. Точный диагноз должен быть поставлен с учетом истории болезни, симптоматики и серологических данных.

Только результаты теста не могут быть основой для терапевтических заключений.

11.3 Ответственность

Любая модификация тестового набора и/или замена или перемена любых компонентов тестового набора могут отрицательно повлиять на результаты теста. Такие действия не дадут права на замену набора.

Любые претензии, связанные с неверной интерпретацией лабораторных результатов, также недействительны. Производитель не несет ответственности за повреждения во время транспортировки.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
ул.Чорновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com